

# 難分解性 Tris(2-chloroethyl) phosphate 分解菌のスクリーニング

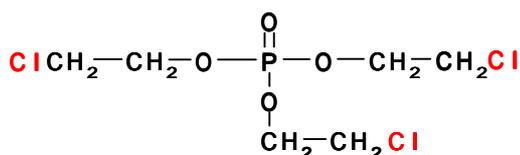
環境生物化学研究室 堀野定利

指導教官 山田良平、解良芳夫、高橋祥司

## 1. 目的

有機リン酸トリエステル類は、プラスチックの可塑剤、難燃化剤、殺虫剤や殺菌剤、溶剤、潤滑油の添加剤等に広く使用されてきた。これまでに行われた研究で、神経毒性、発ガン性、変異原性、催奇形性などが報告されている。また、製造・加工、使用及び廃棄の各段階において環境中への侵入が考えられ、実際に工場排水、下水処理場やし尿処理場からの放流水、家庭雑排水などから検出されており、中でも埋立処分された廃棄物からの浸出水への溶出が懸念されている。

有機リン酸トリエステルの、環境中の微生物による分解が報告される中、Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) や Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) などの含塩素有機リン酸トリエステルは、微生物分解が報告されておらず、プラスチック製品等の使用増大による環境中への蓄積が考えられるため、早急な対応が必要である。さらに、TCEP は水溶解度が高く、浸出水への溶出による、環境汚染が予想される。そこで本研究では TCEP を用い、これを分解する微生物を探索することを目的とした。



分子量	285.49
水溶解度	$7 \times 10^3$ mg/l
LC <sub>50</sub> 値	Killifish 210 mg/l Goldfish 90 mg/l

図 1. TCEP の構造

## 2. スクリーニングの方法

長岡市周辺で採取した野外試料 46 試料

TDCPP を唯一のリン源として集積培養を行って得られた培養液 3 試料

の計 49 試料についてスクリーニングを行った。

TCEP を唯一のリン源として、30℃, 165 rpm で 5 日間振とう培養を行った。2 回の植え継ぎで、有意な生育のみられた培養液を選抜した。

## 3. スクリーニング結果

スクリーニングの結果、TCEP 分解能を有すると思われる培養液、13 試料が得られた。

## 4. TCEP 除去能評価

得られた 13 試料によって TCEP が除去されるかを調べるため、培地中の TCEP を酢酸エチルで抽出し、その抽出液をリン化合物に特異的な検出器を備えたガスクロマトグラフィーを用いて測定した。

表 1 培養 3 回目における生育

試料番号	培養 0 日目 OD <sub>660</sub>	培養 5 日目 OD <sub>660</sub>
No.13	0.003	0.932
No.31	0.004	0.515
No.45	0.004	0.331
No.50	0.002	0.103
No.51	0.002	0.562
No.52	0.002	0.182
No.61	0.005	0.305
No.63	0.006	0.453
No.67	0.005	0.593
No.72	0.003	0.458
No.13 - D*	0.012	0.792
No.45 - D*	0.004	0.368
No.50 - D*	0.004	0.104

D : TDCPP をリン源として集積培養を行った培養液

その結果、13 試料すべての培養液において、TCEP 除去が確認された。1~4 日で、TCEP の完全除去がなされた。

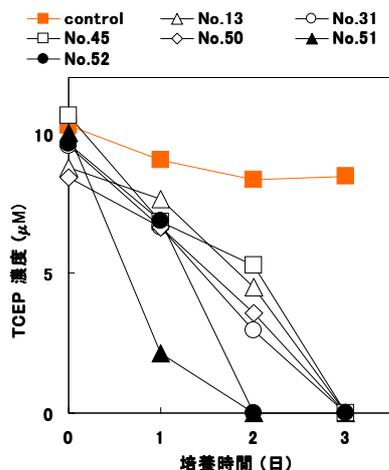


図 2. 混合培養液による TCEP 除去

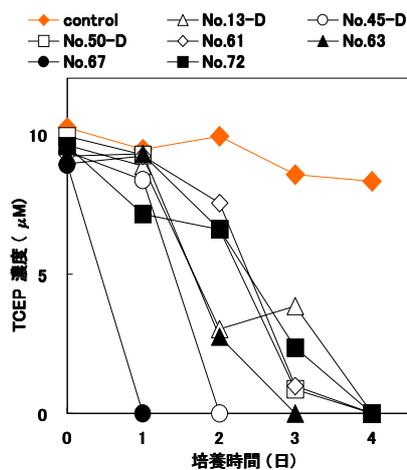


図 3. 混合培養液による TCEP 除去

## 5. 集積培養

4. で得られた培養液について、繰り返し継代培養することにより、安定して高い分解活性を有する培養液を取得し、その中で、もっとも効率的に TCEP 除去を行う微生物群を選抜することを試みた。その結果をまとめた表を以下に示す。

継代培養を繰り返すことにより、TCEP 完全除去に要する日数が減少した。もっとも短いものは No.67 で、1 日であった。

ここで得られた培養液は、これ以降、試料番号の後に「E」をつけるものとする。

試料	TCEP 完全除去に要する日数		継代回数
	継代 1 回目	継代後	
No.13	5日	→ 4日	3
No.31	5日	→ 4日	3
No.45	6日	→ 3日	3
No.50	5日	→ 3日	3
No.51	6日	→ 3日	3
No.52	5日	→ 3日	5
No.61	7日	→ 4日	3
No.63	5日	→ 4日	4
<b>No.67</b>	<b>2日</b>	<b>→ 1日</b>	<b>9</b>
No.72	8日	→ 3日	3
No.13-D	5日	→ 4日	5
No.45-D	3日	→ 3日	6
No.50-D	8日	→ 7日	3

## 6. 塩化物イオン濃度の測定

TCEP が分解された場合、代謝産物の一つとして塩化物イオンの遊離が考えられる。そこで、培地中の TCEP 濃度の経時変化とともに、塩化物イオン濃度の経時変化についても測定を行った。塩化物イオン濃度は、チオシアン酸水銀法により測定した。接種源として集積培養によって得られた No.67-E の培養液を用い、初期菌体濁度は 0.05 とした。

測定の結果、TCEP が 2 時間で完全に除去され、遅れて塩化物イオンの遊離がみられた。

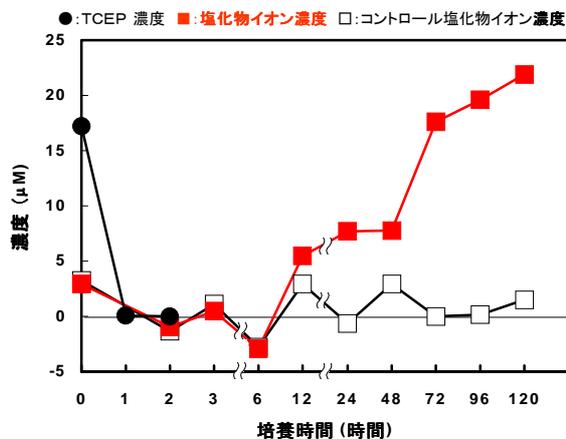


図 4. 塩化物イオン濃度の経時変化